

**Univerzita Karlova**  
**Přírodovědecká fakulta**

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Biologie



**Kristina Rochlová**

Vznik komplexních chromozomových přestaveb v nádorových buňkách a jejich význam

Formation of complex chromosomal rearrangements in cancer cells and significance  
of these events

Bakalářská práce

Vedoucí práce: doc. RNDr. Zuzana Zemanová, CSc.

Praha, 2020

### **Prohlášení**

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

Ve Slaném dne

---

Kristina Rochlová

## **Poděkování**

Tímto bych chtěla poděkovat vedoucí mé bakalářské práce doc. RNDr. Zuzaně Zemanové, CSc. za odbornou pomoc a vedení. Dále děkuji své rodině, partnerovi a přátelům za jejich podporu během celého období mého studia.

## **Abstrakt**

Chromoanageneze je souhrnné označení recentně popsaných katastrofických událostí vedoucích ke vzniku komplexních karyotypů. Tyto události se dle charakteristických znaků dělí na chromothripsis, chromoplexis a chromoanasyntesis. Chromothripsis představuje rozpad chromozomů nebo jejich částí až na stovky malých fragmentů. Ty jsou posléze znovu chybně spojovány. Přestavby typu chromoplexis se od chromothripsis příliš neliší. Hlavní rozdíl představuje nižší počet zlomových míst a distribuce aberací v celém genomu. Během chromoanasyntesis dochází k chybným replikačním procesům, jejichž následkem vznikají četné strukturní varianty.

Existuje několik mechanismů zodpovědných za vznik zlomů v molekule DNA. V případě chromothripsis je pravděpodobně nejdůležitějším mechanismem formace mikrojádra. U chromoplexis má hlavní roli transkripční stres. Replikační stres je spjat s chromoanasyntesis. Výsledkem všech těchto procesů jsou vysoce přestavěné chromozomy s četnými ztrátami, nebo zisky genetického materiálu.

Tato práce shrnuje současné poznatky o uvedených mechanismech vzniku komplexních aberací. Zároveň představuje souvislost mezi komplexním karyotypem a klonálním vývojem buněk. Dále jsou uvedeny cytogenomické metody používané k detekci chromozomových abnormalit včetně jejich charakteristiky.

## **Klíčová slova**

chromoanasyntesis, chromoplexis, chromothripsis, kancerogeneze, klonální vývoj, komplexní chromozomové aberace, reparace DNA, replikace, telomera

## **Abstract**

Chromoanagenesis is a catch-all term of recently described catastrophic events that generate complex karyotypes. These events are divided according to the characteristic features and are termed chromothripsis, chromoplexis and chromoanasythesis. Chromothripsis represents a disintegration of chromosomes or their parts into hundreds of small fragments. Those chromosome fragments are then incorrectly reassembled. Chromoplexis rearrangements are not very different from chromothripsis rearrangements. The main difference is a lower number of breakpoints and the distribution of aberrations in the whole genome. The erroneous replication processes occur during chromoanasythesis.

There are several mechanisms responsible for breakdowns of a DNA molecule. In the case of chromothripsis, micronucleus formation is probably the most important mechanism. During chromoplexis, transcriptional stress plays a major role. Replication stress is associated with chromoanasythesis rearrangements. The result of all these processes are highly rearranged chromosomes with numerous losses or gains of genetic material.

This work summarizes the current knowledge of the mechanisms that are mentioned above and the genesis of complex aberrations. At the same time, it represents the connection between complex karyotype and clonal cells development. Cytogenomic methods that are used to detect chromosomal abnormalities including their characteristics are also stated.

## **Key words**

carcinogenesis, chromoanasythesis, chromoplexy, chromothripsis, clonal evolution, complex chromosomal aberrations, DNA repair, replication, telomere

## Seznam použitých zkratk

(M/k) bp	(mega/kilo) párů bází
alt-EJ	alternativní spojování konců
AR	androgenový receptor (= jaderný transkripční faktor)
array CGH	komparativní genomová hybridizace na čípech
BFB	zlom-fúze-most cyklus („breakage-fusion-bridge“)
ETS	E26 transformačně-specifická proteinová rodina pro transkripční faktory
FISH	fluorescenční <i>in situ</i> hybridizace
FoSTeS	zastavení replikační vidličky a výměna templátů
G2	postsyntetická druhá přípravná fáze buněčného cyklu
GGA(A/T)	guanin guanin adenin (adenin/thymin)
HERV	lidský endogenní retrovirový element
HSR	homogenně se barvící oblasti
I-FISH	interfázni fluorescenční <i>in situ</i> hybridizace
LCR	repetitivní sekvence s nízkým opakováním
LINE	dlouhé rozptýlené jaderné elementy
LOH	ztráta heterozygotnosti
M	mitotická fáze buněčného cyklu
mBAND	mnohobarevné pruhování s vysokou rezolucí
mFISH	mnohobarevná fluorescenční <i>in situ</i> hybridizace
MMBIR	replikace umožněná prostřednictvím mikrohomologií
NAHR	nealelická homologní rekombinace
NGS	sekvenování nové generace
NHEJ	spojování nehomologních konců DNA řetězců
PRDM9	protein 9 se zinkovým prstem a PR doménami
SINE	krátké rozptýlené jaderné elementy

SNP	jednonukleotidový polymorfizmus
<i>TMPRSS2</i>	gen kódující transmembránovou serinovou proteázu 2
<i>TP53</i>	nádorový supresorový gen kódující protein p53
WCP FISH	fluorescenční <i>in situ</i> hybridizace s malovacími sondami pro celé chromozomy
WES	celoexomové sekvenování
WGS	celogenomové sekvenování

# Obsah

<b>1</b>	<b>Úvod.....</b>	<b>1</b>
1.1	Cíle bakalářské práce.....	2
<b>2</b>	<b>Chromozomové přestavby.....</b>	<b>3</b>
2.1	Mechanismus vzniku přestaveb.....	3
2.2	Typy chromozomových přestaveb.....	4
2.3	Marker chromozomy .....	6
2.4	Komplexní chromozomové přestavby.....	7
2.5	Klonální vývoj a vnitřní heterogenita nádorů.....	8
<b>3</b>	<b>Mechanismy vzniku komplexních chromozomových přestaveb .....</b>	<b>11</b>
3.1	Chromothripsis .....	11
3.2	Chromoplexis.....	15
3.3	Chromoanasyntesis .....	17
<b>4</b>	<b>Nejdůležitější cytogenomické metody detekce chromozomových přestaveb.....</b>	<b>19</b>
<b>5</b>	<b>Úloha komplexních aberací v nádorovém procesu .....</b>	<b>22</b>
<b>6</b>	<b>Závěr.....</b>	<b>23</b>
	<b>Seznam zdrojů .....</b>	<b>25</b>



# 1 Úvod

Proces nádorové transformace buněk byl dlouhou dobu popisován jako postupná kumulace chromozomových aberací a genových mutací v buněčném genomu. Teprve Philip J. Stephens se svými kolegy prokázali neobvyklé strukturní variace, které popírají toto klasické schéma. Výsledkem jejich analýzy byl důkaz současného vzniku 42 chromozomových přestaveb postihujících krátké rameno chromozomu 4 u pacientky s chronickou lymfocytární leukémií. Takto vzniklé přestavby mají potenciál generovat velké množství tumorogenních mutačních změn během velmi krátkého časového období. Tento jev byl označen názvem chromothripsis (Stephens et al., 2011).

Po objevení chromothripsis v roce 2011 postupně došlo k odhalení dalších příbuzných typů komplexních chromozomových aberací, hromadně označovaných jako chromoanageneze. Nečekaný objev těchto nových forem genomových nestabilit byl umožněn zavedením mikročipových technologií a sekvenování nové generace (Holland a Cleveland, 2012). Tyto jevy byly posléze pozorovány u řady nádorových onemocnění a také v germinálních buňkách u pacientů s vrozenými vadami (Kloosterman et al., 2011). Jejich přítomnost byla zaznamenána také u zdravých lidí, u kterých však často ovlivňuje reprodukční zdatnost. Chromoanageneze mohou být přeneseny na potomky, kteří se již můžou od svých rodičů fenotypově lišit a trpět řadou zdravotních postižení (De Pagter et al., 2015).

Ačkoliv byly tyto katastrofické komplexní aberace popsány na základě analýz genomů pacientů s určitým typem onemocnění, nejsou rozšířené pouze mezi lidmi. Jejich výskyt byl prokázán napříč širokým spektrem organismů od rostlinné (Tan et al., 2015) po živočišnou říši (Carbone et al., 2014). To poukazuje na jejich významnou roli jakožto hnacího motoru karyotypové evoluce. Chromoanageneze významně přispěly ke změně pohledu na vývoj druhů. Příkladem mohou být výhodné masivní chromozomové přestavby urychlující adaptaci organismu na nové prostředí (Crombach a Hogeweg, 2007).

Téma komplexních chromozomových přestaveb jsem si pro svou bakalářskou práci vybrala z důvodu dlouhodobého zájmu o oblast kancerogeneze a vize svého budoucího uplatnění v klinické biologii. Proto je práce soustředěna spíše na klinický dopad chromoanagenezí v nádorových buňkách než na jejich neméně zajímavou a důležitou roli v evoluci druhů.

## **1.1 Cíle bakalářské práce**

Cílem bakalářské práce je přinést ucelený přehled současných poznatků o komplexních chromozomových přestavbách v nádorových buňkách, porovnat charakteristické znaky a mechanismy jejich vzniku. Práce dále shrnuje nejdůležitější cytogenetické a molekulárně cytogenetické metody používané k detekci těchto aberací. V neposlední řadě je poukázáno na úlohu chromoanagenezí v nádorové transformaci buněk.

## 2 Chromozomové přestavby

Lidský karyotyp nezůstává během evoluce zcela konstantní. Průběžně může docházet ke změnám struktury či počtu chromozomů v buněčném jádře. Získané chromozomové přestavby nezdědka zahrnují funkční geny, které mají regulační funkci v procesu proliferace buněk a jsou posléze základem lidských nádorových onemocnění. Příčinou jejich rozvoje bývá primární nenáhodná aberace, která přímo souvisí s konkrétním subtypem maligního onemocnění. Průběžně pak mohou vznikat další sekundární genomové změny, které souvisí s progresí nádorového klonu. Může se jednat o změny nenáhodné (rekurentní), nebo o změny náhodné (Bozic et al., 2010).

### 2.1 Mechanismus vzniku přestaveb

Předpokladem vzniku chromozomové přestavby je dvouvláknový zlom v molekule DNA. Ten obvykle způsobí exogenní klastogeny, jako jsou chemická činidla (Kageyama et al., 2015) či ionizační záření (Morishita et al., 2016). Zlomy v DNA mohou vznikat také účinkem endogenních klastogenů, např. volných radikálů v organismu (Szatrowski a Nathan, 1991). K indukci chromozomových aberací může docházet i náhodnými chybami během buněčných procesů, typicky během chybného crossing-overu (Lauer et al., 1980), eventuálně ve spojení s replikačním stresem způsobeným např. chemikáliemi zastavujícími replikaci (Durkin et al., 2008).

Po vzniku zlomů jsou v buňce spuštěny opravné procesy, které mají snahu tato poškození co nejrychleji napravit. Právě reparační mechanismy velkým dílem přispívají ke vzniku chromozomových přestaveb. Jedná se o procesy založené na replikaci či rekombinaci. Mezi hlavní rekombinační mechanismy patří NAHR (rekombinace regionů s vysokou sekvenční podobností, ale s odlišným umístěním v genomu) a NHEJ (spojení volných konců z dvouvláknových zlomů bez přítomnosti homologií) (Shaw a Lupski, 2005).

Replikační mechanismy jsou zastoupeny především principem FoSTeS (pozastavení replikační vidličky a oddělení hlavního templátového řetězce, jeho invaze do jiné replikační vidličky a restart replikace díky mikrohomologiím mezi vyměněným templátem a originálním vláknem). Okolnosti, jako směr pohybu obnovené replikační vidličky nebo inserce vedoucího či opožděného vlákna DNA, určují, zda se bude nový fragment molekuly DNA tvořit v přímém, nebo invertovaném směru. Dalším alternativním mechanismem bývá replikace prostřednictvím mikrohomologií – MMBIR (Zhang et al., 2015). Velký vliv na indukci chromozomových

přestaveb mají také repetitivní sekvence, případně inserce mobilních elementů do genomu. Například rekombinací mezi HERV elementy snadno dojde ke vzniku delece či duplikace (Campbell et al., 2014). Některá místa na chromozomech jsou preferenčně náchylnější ke vzniku chromozomových přestaveb. Odhalení pomocných faktorů vzniku NAHR umožňuje mapování těchto kritických míst v lidských genomech. Jako užitečný pomocník při tomto mapování se jeví protein PRDM9. Varianty tohoto proteinu silně ovlivňují místa rekombinace považovaná za hotspoty vzniku NAHR (Baudat et al., 2010).

## 2.2 Typy chromozomových přestaveb

Chromozomové aberace se dají rozdělit na strukturní a numerické. Numerické aberace, postihující počet chromozomů, se dále člení na polyploidie a aneuploidie. Při polyploidii dochází ke znásobení celé chromozomové sady (triploidie, tetraploidie atd.). Aneuploidie označuje stav, kdy dochází ke ztrátě, nebo zisku jednotlivých chromozomů (např. monosomie či trisomie). Tyto aberace vznikají nejčastěji následkem mitotických poruch, tj. špatným rozchodem chromozomů do dceřiných buněk (Thompson a Compton, 2011).

Strukturní přestavby obvykle vznikají během procesu replikace či chybnou opravou dvouřetězcových zlomů v molekule DNA. Tyto aberace zahrnují zejména delece, duplikace, inverze, inserce, translokace, kruhové chromozomy a izochromozomy (Thompson a Compton, 2011).

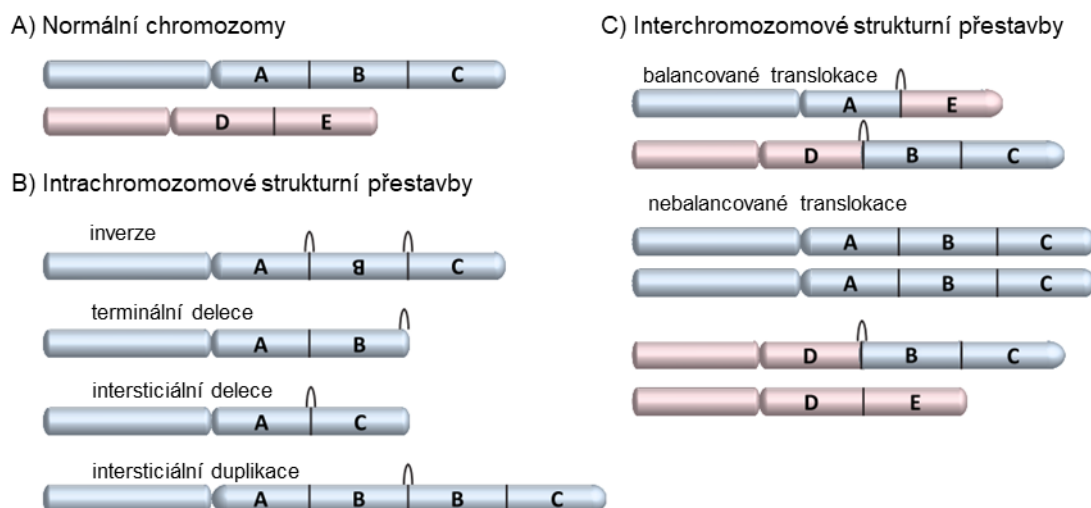
Delece, duplikace a inverze náleží mezi intrachromozomové aberace, při kterých dochází k jednomu nebo dvěma dvouřetězcovým zlomům v rámci jednoho chromozomu (Weckselblatt a Rudd, 2015). Delece (= ztráta chromozomových segmentů) se mohou vyskytovat uvnitř chromozomového ramene – pak se jedná o delece intersticiální. Delece zahrnující konec chromozomového ramene včetně telomery se označují za terminální. Při duplikacích dochází ke vzniku nadpočetných kopií genů nebo DNA segmentů. Inverze vznikají otočením chromozomového materiálu mezi dvěma zlomovými místy. Pokud zasahuje dlouhá i krátká ramena chromozomu, tj. zahrnuje i oblast centromery, nazývá se pericentrickou. Inverze vznikající v důsledku zlomů na jednom chromozomovém rameni bez zahrnutí centromery se označuje za paracentrickou (Weckselblatt a Rudd, 2015).

Translokace, při kterých dochází ke zlomům na dvou nebo více chromozomech a následnému přemístění chromozomového materiálu, se dělí na reciproké a nereciproké. Jestliže je výměna chromozomového materiálu vzájemná, jedná se o translokace reciproké

(= balancované). Při nerekiproké translokaci dochází k přenosu chromozomového materiálu z jednoho chromozomu na jiný (Thompson a Compton, 2011).

Během inserce dochází k vyštěpení chromozomového fragmentu z jednoho chromozomu a jeho následovnému začlenění do chromozomu jiného. Aby mohla inserce proběhnout, je zapotřebí alespoň tří zlomů v molekule DNA (Leister, 2005). Následkem chybného rozchodu chromatid během buněčného dělení může dojít ke vzniku izochromozomů. Spojené chromatidy se namísto podélně rozdělí příčně a dochází ke ztrátě jednoho chromozomového ramene. Druhé chromozomové rameno je zdvojeno a chromozom je tvořen pouze materiálem z dlouhých, či krátkých ramen. Jestliže dojde ke zlomu v distálních částech chromozomových ramen, jsou tyto konce obvykle ztraceny. Chromozom se poté může stočit a vzájemně své terminální oblasti spojit. Takový chromozom je označován jako kruhový, tj. ring chromozom (Robinson et al., 1994).

Strukturní chromozomové aberace se dále dělí podle toho, zda při nich dochází ke změnám v obsahu genetického materiálu, a to na balancované (reciproké translokace, inverze, inserce) a nebalancované (delece, duplikace, inserce, izochromozomy, kruhové chromozomy). Následkem nebalancovaných přestaveb dochází ke ztrátám, nebo naopak získům genetického materiálu. Při balancovaných aberacích dochází k přemístění genetického materiálu a jeho množství je zachováno (Gilbert, 1983).

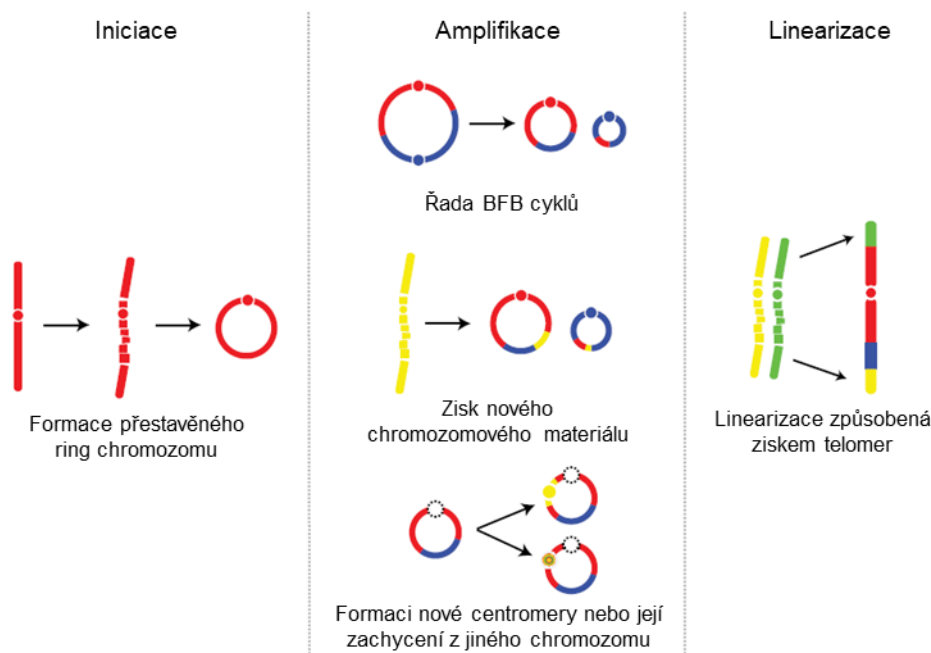


Obrázek 1 – Znáznornění nejčastějších typů strukturních chromozomových přestaveb. Obloučky nad chromozomy znázorňují místa zlomu. Podle: Weckselblatt a Rudd, 2015

## 2.3 Marker chromozomy

Marker chromozomy představují strukturně abnormální chromozomy, které nelze jednoznačně identifikovat základním cytogenetickým vyšetřením. V germinálních buňkách se jedná o malé, nadpočetné chromozomy, které se výrazně liší od klasických autozomů či gonozomů. Mohou se vyskytovat v kruhové formě s centromerou, nebo zcela bez centromery. Chromozom postrádající centromeru bývá menší, nestabilní a často v mozaikové formě. Většina nosičů těchto malých, nadpočetných marker chromozomů nemá žádné klinické projevy. Rozdílná úroveň mozaicizmu však může vést také k odlišným fenotypovým projevům a výskytu těžce postižených jedinců s nejrůznějšími vývojovými vadami (Liehr et al., 2013).

Velmi často vznikají také jako získané změny v nádorových buňkách. Na rozdíl od vrozených marker chromozomů mohou být většího rozsahu a dosahovat i nadměrných velikostí (více než 600 Mbp). V onkogenetice se tyto nadměrné marker chromozomy někdy označují pojmem neochromozomy. Jejich utváření zahrnuje tři hlavní fáze. Nejdříve dojde následkem např. chromoanagenezí ke vzniku derivovaného kruhového chromozomu. Ten poté prochází několika tzv. BFB cykly. Postupně může docházet k zisku nového chromozomového materiálu z jiných chromozomů (v případě chromoanagenezí chromozomových fragmentů z rozpadnutých chromozomů), často i s centromerou, která poté nahrazuje centromeru stávající. Nakonec dojde k linearizaci chromozomu a vytvoření telomer. Není výjimkou, že během celého procesu postupné formace neochromozomů může dojít k několikanásobné amplifikaci onkogenů, nebo naopak k epigenetickému umlčení některých dalších přidružených genů. Asociace neochromozomů s nádorovým procesem je tedy více než zřejmá (Garsed et al., 2014).



Obrázek 2 – Vznik neochromozomu. Podle: Garsed et al., 2014

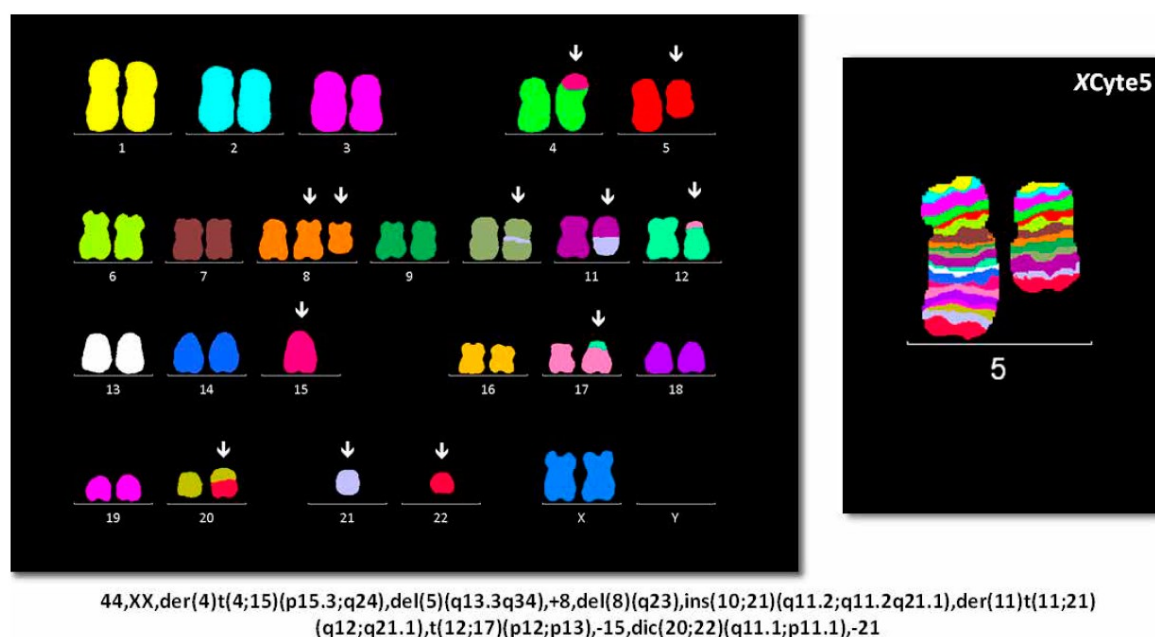
## 2.4 Komplexní chromozomové přestavby

Komplexní chromozomové přestavby představují numerické či strukturní změny genomu, které zahrnují alespoň tři chromozomy a nebo strukturní přestavby, při kterých dochází ke třem a více zlomům na chromozomech (Schoch et al., 2001). Tyto rozsáhlé aberace se často vyskytují v nádorových buňkách. Jejich vznik podmiňuje klonální evoluce buněk a často souvisí s progresí nádorového onemocnění. Pravděpodobně existuje spojitost mezi agresivitou nádorového onemocnění a vznikem subklonů se sekundárními aberacemi nebo komplexními karyotypy (Ramos et al., 2000). Rozvoj nových cytogenomických metod schopných odhalit i řadu kryptických aberací s sebou přinesl zjištění, že výskyt komplexních přestaveb je mnohem častější, než se dříve předpokládalo. Relativně nedávno přinesl nový pohled na možné mechanismy jejich vzniku objev tzv. chromoanagenezí. Jejich následkem vzniká velké množství chromozomových aberací napříč genomem, a to i během jednoho buněčného cyklu (Holland a Cleveland, 2012).

Vzniklé změny mohou ovlivnit funkci řady genů v blízkém okolí nebo způsobit jejich úplnou disrupci. Genovou expresi ovlivňuje např. poziční efekt, kdy se gen následkem přestaveb dostane do oblasti, která umlčí jeho expresi. Umístění genu do blízkého okolí silného promotoru může jeho expresi naopak posílit. Následkem zlomů uvnitř genů mohou vznikat

proteiny s odlišnými vlastnostmi. Ty vznikají také následkem změn v počtech kopií genů způsobených ztrátou celých chromozomů či chromozomových fragmentů, nebo naopak amplifikací chromozomového materiálu. V důsledku četných strukturních přestaveb mohou vznikat také fúzní geny, které přispívají k nestabilitě genomu (Weckselblatt a Rudd, 2015).

Komplexní chromozomové přestavby byly pozorovány i v germinálních buňkách. Jedinci nesoucí tyto aberace nemusí vykazovat klinické projevy, ale také mohou trpět např. samovolnými potraty, neplodností, mentálním postižením, případně vývojovými vadami (Vermeulen et al., 2004).



Obrázek 3 – Příklad komplexního karyotypu detekovaného metodami mFISH a mBAND u pacientky s myelodysplastickým syndromem. Převzato z: Zemanová et al., 2019

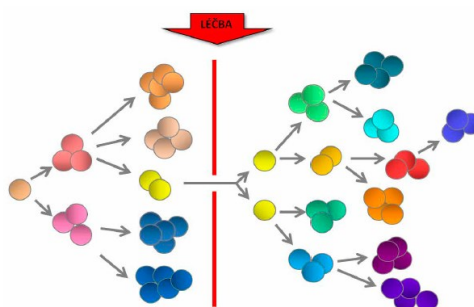
## 2.5 Klonální vývoj a vnitřní heterogenita nádorů

Vznik nádoru se odvíjí od vzniku řídicí, tzv. „driver“ mutace. Tato spouštěcí mutace obvykle nastává v raných fázích nádorové transformace buněk a je možno ji identifikovat ve všech oblastech nádorové tkáně. Zvýšená míra chromozomové nestability se projevuje klonálním vývojem provázeným vznikem dalších cytogenetických změn (Nowell, 1976). Skupina buněk sdílejících stejný genotyp a mutační profil představuje klon. Vznikají však také další heterogenní subklony. Ty mohou být odvozeny od jednoho základního buněčného klonu (= příbuzné klony), či naopak geneticky nezávislé (= nepříbuzné klony). V průběhu onemocnění můžou tyto subklony vymizet, nebo naopak získat proliferační výhodu, díky které



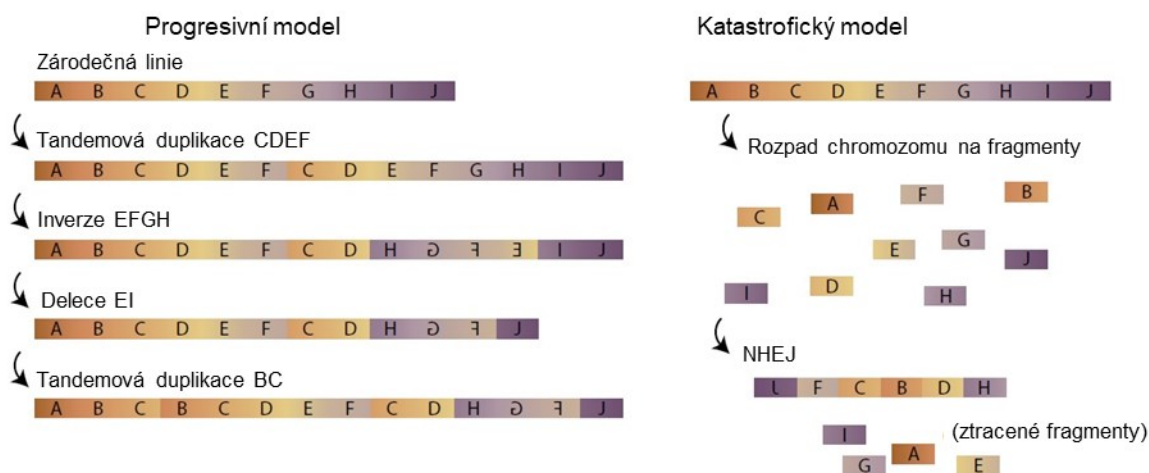
dojde k jejich klonální expanzi. Populace těchto oddělených subklonů dává vzniknout heterogennímu prostředí v rámci nádoru (Juliussen et al., 1988). Jednotlivé subklony nejsou od sebe izolované a může docházet k jejich prolínání vedoucímu k vzájemným kompeticím, nebo naopak společným interakcím. Jestliže se jednomu dominantnímu klonu dostává výhodnějších podmínek, může svou expanzí vytlačit klony jiné a způsobit jejich redukci (Nowell, 1976).

Popsaný jev je pokládán za jeden z hlavních mechanismů vzniku a následné progresu nádoru. Právě klonální heterogenita je často spjata s komplexními karyotypy spojenými s agresivnějším průběhem onemocnění a se špatnou prognózou. Při nálezů chromozomových aberací je velmi důležité, zda se tyto změny vyskytují pouze v jednom buněčném klonu, nebo ve více heterogenních klonech. Klonální heterogenita a genetická diverzita buněk jsou jedním z nejčastějších důvodů rezistence na léčbu, klonální evoluce a relapsu onemocnění (Zemanová et al., 2019).



Obrázek 4 – Znáznornění klonální heterogenity jako příčiny rezistence na léčbu. Převzato z: Zemanová et al., 2019

Klasické schéma nádorové transformace popsané výše předpokládá, že aberace vznikají postupně, náhodně v celém genomu a hromadí se v průběhu času. Komplexní chromozomové aberace typu chromoanagenezí však ukazují, že chromozomové přestavby mohou vzniknout i najednou během jediné katastrofické události. Nasvědčuje tomu výskyt aberací v klastrech či mnohonásobné střídání zasažených oblastí se ztrátou nebo zachováním heterozygotnosti. Vzniklé přestavby bývají rozsáhlého charakteru s významným dopadem na funkce mnoha genů, které mají důležitou roli v regulaci buněčného cyklu či dysfunkci telomer. Buňky postižené aberacemi typu chromoanagenezí mají proto obvykle agresivní fenotyp (Stephens et al., 2011).



Obrázek 5 – Porovnání klasického progresivního schématu nádorové transformace s katastrofickým modelem vzniku přestaveb během jediné události. Podle: Stephens et al., 2011

### 3 Mechanizmy vzniku komplexních chromozomových přestaveb

Pojem chromoanageneze (*chromo* neboli chromozom, *anagenesis* čili znovuzrození) souhrnně označuje tři hlavní jevy, a to chromothripsis, chromoplexis a chromoanasyntesis. Prozatím není zcela jasné, během které fáze tumorogeneze k těmto aberacím dochází. Je však zřejmé, že jejich vznik úzce souvisí s progresí nádorového onemocnění (Holland a Cleveland, 2012).

#### 3.1 Chromothripsis

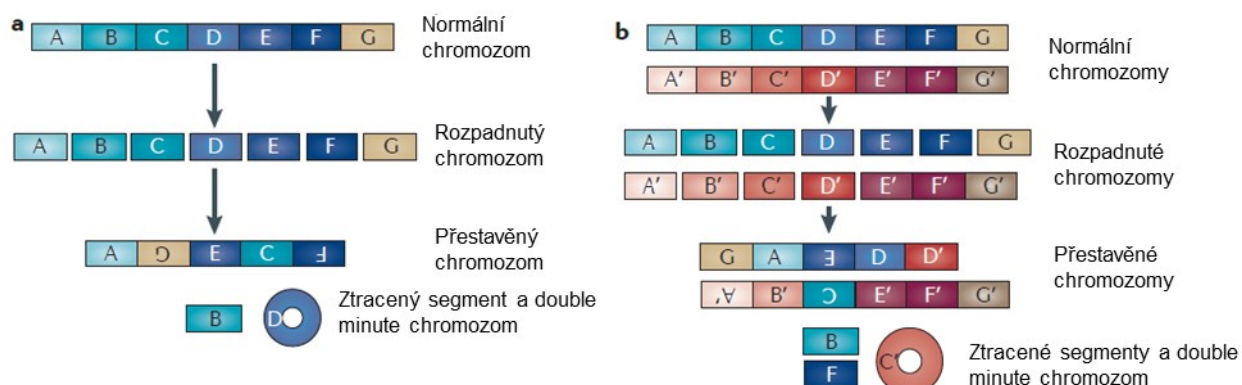
Termín chromothripsis byl odvozen z řeckého slova *chromos*, značící chromozom, a *thripsis* neboli roztříštění na kousky. Tento fenomén byl poprvé popsán v roce 2011 u pacientky s chronickou lymfocytární leukémií ve čtyřech buněčných liniích (Stephens et al., 2011).

##### Charakteristické rysy

Během jediné události dochází k masivnímu rozpadu jednoho nebo více chromozomů, případně jejich částí, na desítky až stovky malých fragmentů. Buňka se snaží tato rozsáhlá poškození co nejdříve napravit. Chromozomové fragmenty jsou však v rámci buněčných reparačních mechanismů spojovány zpět náhodně, a tedy nepřesně. Nově vzniklý přestavěný chromozom tak neodpovídá původní struktuře. Hlavními nápravnými mechanismy jsou procesy založené na mikrohomologii (MMBIR) a nehomologním spojování konců DNA (NHEJ). Dochází ke vzniku rozsáhlých, ale lokalizovaných přestaveb zahrnujících celé chromozomové rameno, malé úseky na chromozomu, případně celý chromozom. Zlomy se obvykle vyskytují ve shlucích neboli klastrech, kdy se střídají úseky neporušené DNA s úseky cca 50 kbp o 5 až 10 zlomech. Důsledkem chromothripsis může být vznik delecí, inverzí, translokací či amplifikací genetického materiálu. K poškození pravděpodobně dochází v období, kdy jsou chromozomy kondenzovány ve stádiu metafáze, proto jsou později přestavby vysoce lokalizované (Stephens et al., 2011).

Z mnoha experimentálních studií vyplývá, že by k těmto rozsáhlým přestavbám mohlo docházet během jediného buněčného dělení. Nejvíce tomu naznačuje vysoký počet kopií DNA kolísajících mezi jednou (delece) až třemi (duplikace) alelami. Alely se standardně vyskytují ve dvou kopiích. Jestliže dojde k nebalancované aberaci, počet kopií DNA se změní. Pokud by se přestavby kumulovaly v průběhu času, jak naznačuje klasické schéma nádorové transformace, musel by se počet kopií DNA změnit v důsledku postupných mnohonásobných

amplifikací anebo delecí chromozomového materiálu. To je však u takto rozsáhlých změn nepravděpodobné (Stephens et al., 2011).



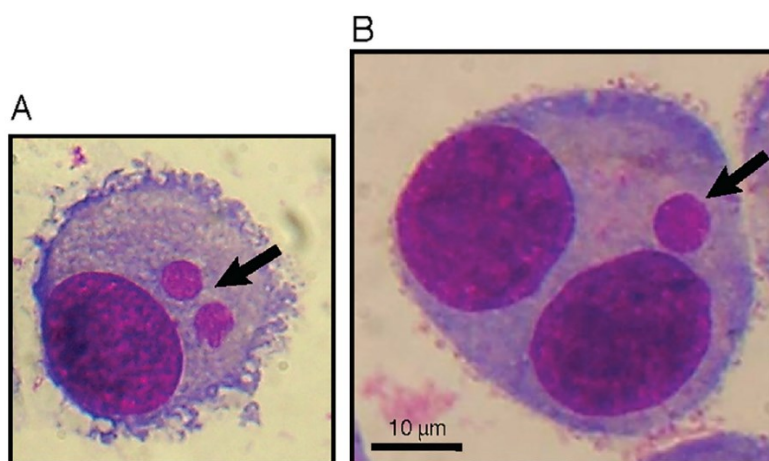
Obrázek 6 – Schématické znázornění chromothripsis: (a) chromothripsis postihující jeden chromozom; (b) chromothripsis zahrnující více chromozomů. Podle: Forment et al., 2012

## Mechanismy vzniku

Prozatím neexistuje jednotný pohled na to, jakým způsobem k chromothripsis dochází, protože se tento jev doposud nepodařilo vyvolat v experimentálních podmínkách. Existuje však několik teorií o příčinách vzniku chromothripsis. Nejvíce přijímaný názor je založen na existenci mimojaderných struktur, tzv. mikrojader. Ty vznikají během mitózy oddělením chromozomů nebo jejich částí od hlavního jádra při přechodu buňky z metafáze do anafáze. Na jejich formaci se mohou podílet také stresové faktory v jakékoli fázi buněčného cyklu. Chromozomy oddělené v mikrojádře se replikují pomaleji než chromozomy v hlavním buněčném jádře, naopak kondenzují a rozpadají se předčasně (Crasta et al., 2012). Vyšší tendence k rozpadu chromozomů je způsobena nedostatečným jaderným obalem, který je tvořen pouze nejnutnějšími proteiny. Tento slabý obal není schopen vytvořit póry umožňující transport proteinů, které se podílejí na udržení integrity genomu (Hatch et al., 2013).

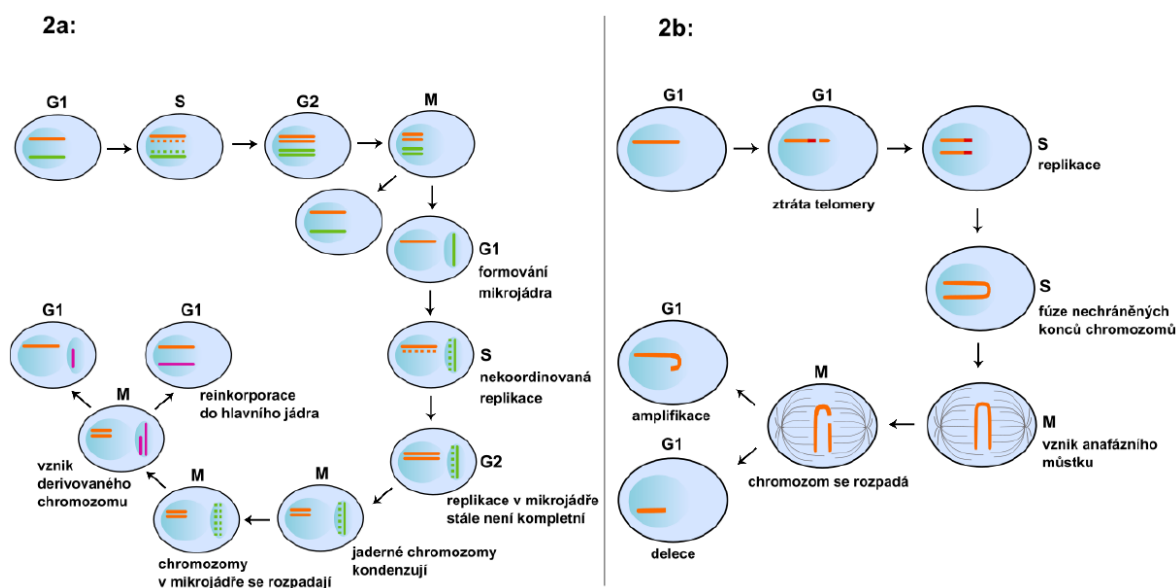
Replikace chromozomů v mikrojádře nemusí být během přechodu z G2 do M fáze buněčného cyklu plně dokončena. Předčasná kondenzace takových neúplně replikovaných chromozomů bývá spouštěčem zlomů v molekule DNA, a tedy může způsobit rozpad chromozomů. Vzniklé chromozomové fragmenty mohou vytvořit tzv. double minute chromozomy či derivované chromozomy, ve kterých jsou chromozomové části náhodně pospojované v různé orientaci a pořadí (Stephens et al., 2011). Double minute chromozomy představují malé, cirkulární fragmenty DNA postrádající centromeru i telomery. Tyto malé částice vznikají rozpadem tzv. homogenně se barvících oblastí (HSR). HSR obsahují

mnohonásobně amplifikované geny, které mají tendenci se rozpadat do double minute (Sanborn et al., 2013). Derivovaný chromozom se může v mikrojádře udržet i několik následujících buněčných cyklů. Jelikož ale postrádá homologní partnerský chromozom, dochází k nesčetným chybám během buněčného dělení. Následkem těchto chyb může, stejně jako v případě double minute chromozomů, dojít k naprosto náhodnému rozdělení derivovaného chromozomu do dceřiných buněk. Často z nich úplně vymizí nebo může dojít k jeho opětovnému začlenění zpět do hlavního buněčného jádra. Následkem toho pak vznikají dceřiné buňky s různě přestavěným genomem (Stephens et al., 2011, Crasta et al., 2012).



Obrázek 7 – Typická podoba mikrojádra (v průměru cca  $1,5\mu\text{m}$ ) přidruženého k hlavnímu buněčnému jádru (na obrázku B jsou hlavní buněčná jádra dvě). Převzato z: Guo et al., 2019

Další možnou příčinou vzniku chromothripsis může být zkracování telomer (Stephens et al., 2011). Abrazie telomer je spjata s vytvářením tzv. BFB cyklů (zlom-fúze-most cykly), kdy dochází k fúzování nechráněných konců chromozomů a vzniku derivovaného, dicentrického chromozomu. Ten se poté klasicky během anafáze napojí na mitotické vřeténko a vytvoří tzv. anafázní můstek. Konce derivovaného chromozomu jsou během cytokineze taženy na opačnou stranu buňky, až dojde k jeho roztržení. Zlom však obvykle nenastává v místě, kde došlo k fúzi a chromozom se rozdělí nerovnoměrně. Jedna dceřiná buňka tedy nese chromozom s deletovanými úseky, druhá s úseky amplifikace. Celý proces BFB cyklu se opakuje tak dlouho, dokud chromozomy nezískají nové telomery. Ty obvykle získají translokací materiálu z jiného chromozomu (McClintock, 1941).

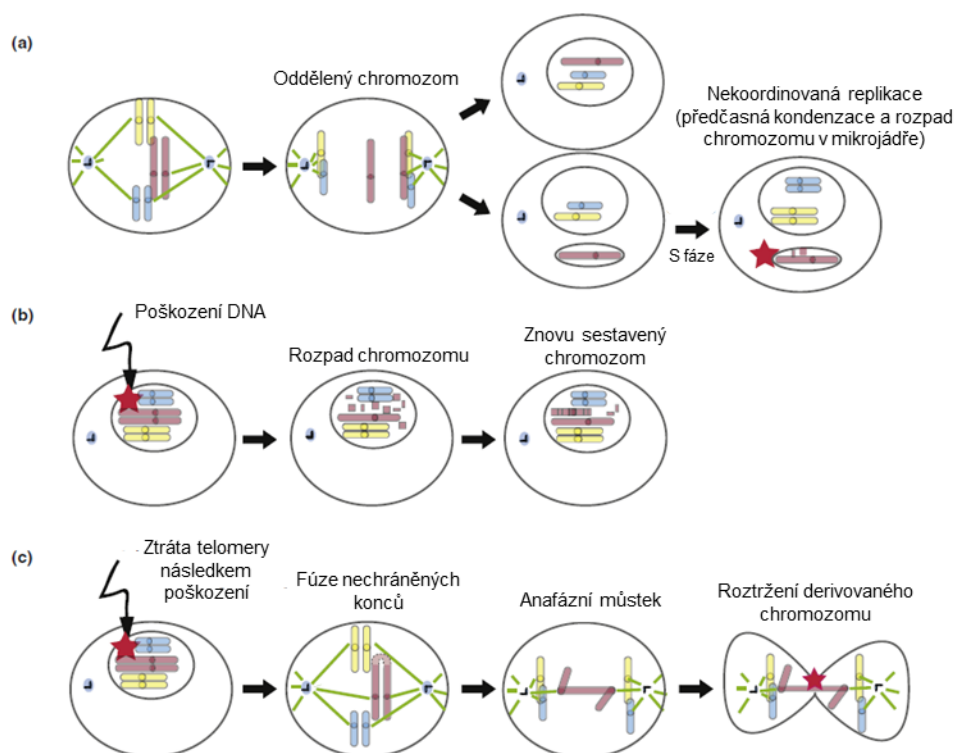


Obrázek 8 – 2a) formace mikrojádra; 2b) zlom-fúze-most cyklus. Převzato z: Závacká et al., 2019

Ke vzniku chromothripsis mohou přispět také exogenní vlivy poškozující DNA, jako jsou např. volné radikály či ionizující záření. Náhodně vzniklé zlomy v molekule DNA aktivují širokou škálu opravných mechanismů (Morishita et al., 2016). Jiným exogenním faktorem může být integrace viru do genomu hostitele způsobující četné zlomy v DNA a nestabilitu napříč genomem (Akagi et al., 2014). Potenciální vliv na indukci chromothripsis může mít také replikační stres zastavující replikační vidličku. K tomu často dochází po aktivaci onkogenů, nebo opožděním replikace související s vytvořením mikrojádra (Holland a Cleveland, 2012).

Dalším možným mechanismem je schopnost buněk unikat apoptóze neboli programované buněčné smrti. Místo podstoupení apoptózy jsou tyto buňky opraveny reparačními procesy za vzniku četných chyb, následkem kterých vznikají chromozomové přestavby (Tubio a Estivill, 2011). Tento, prozatím nedostatečně prozkoumaný, mechanismus je nutné ověřit v dalších studiích.

Správné funkce mechanismů reparace, kontroly buněčného cyklu a údržby telomer má na starosti nádorový supresorový gen *TP53*. Jedná se o regulátor mnoha buněčných procesů s významnou rolí v zajišťování stability genomu. Tento gen zároveň patří k nejčastěji mutovaným nádorovým supresorovým genům (Baker et al., 1989). Inaktivace obou jeho kopií vedou k deregulaci mnoha buněčných pochodů a přispívají ke vzniku chromoanagenezí. Ty jsou často pozorovány také u jedinců nesoucích vrozené mutace tohoto genu (Rausch et al., 2012).



Obrázek 9 – Hlavní pravděpodobné mechanismy zodpovědné za vznik chromothripsis a) existence mikrojádra, b) exogenní vlivy, c) abraze telomer. Podle: Storchová a Kloosterman, 2016

## 3.2 Chromoplexis

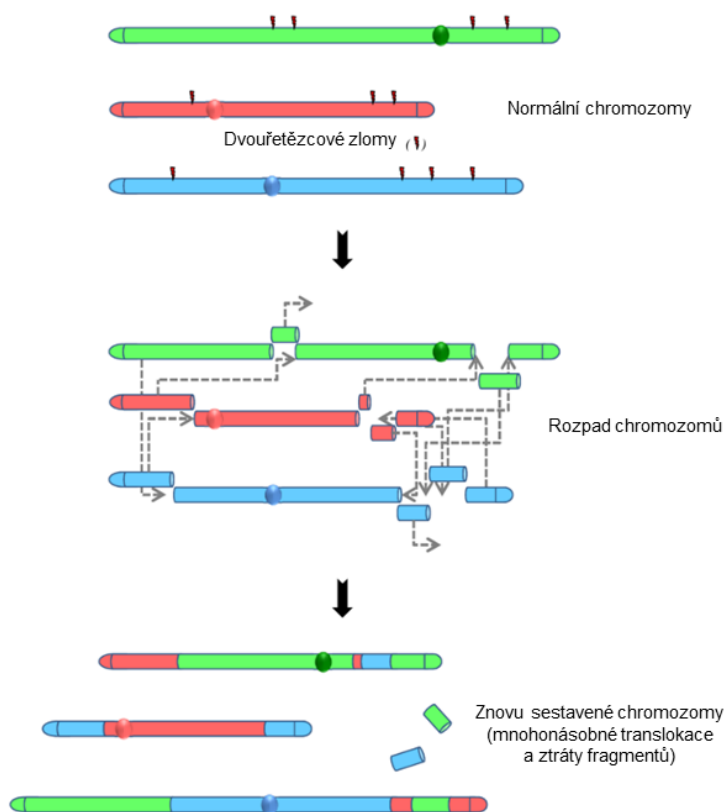
V roce 2013 popsal Sylvan C. Baca se svými kolegy jev, který se velmi podobal chromothripsis. Tento typ masivních chromozomových přestaveb, pozorovaných u pacienta s karcinomem prostaty, pojmenovali chromoplexis (*plexis* = sestavit, splétat). Chromoplexis se od chromothripsis liší především utvářením vzájemně provázaných řetězců přestaveb, které se nevyskytují v klastrech (Baca et al., 2013).

### Charakteristické rysy

Chromoplexis se od chromothripsis odlišuje také počtem vzniklých přestaveb. Zde se jedná o desítky, zatímco v případě chromothripsis až o stovky. Tyto aberace, které vznikají během jednoho buněčného cyklu, mohou zahrnovat oblasti z mnoha různých chromozomů, případně postihnout i celý genom. Vzniklé odchylky představují mnohonásobné interchromozomové a intrachromozomové translokace, inverze a inserce. Ke změnám v počtu kopií chromozomových fragmentů dochází jen ve velmi malé míře nebo vůbec. Stejně jako v případě chromothripsis i tady předchází přestavbám rozpad chromozomů a jejich zpětné sestavení provázené řadou chyb. Hlavní roli zde opět hraje mechanismus NHEJ doplněný o proces alt-EJ (Baca et al., 2013).

## Mechanismus vzniku

Výskyt aberací v oblastech otevřeného chromatinu naznačuje souvislost mezi transkripcí či replikací a tvorbou zlomů v DNA. V případě chromoplexis tedy pravděpodobně hraje největší roli replikační a transkripční stres (na rozdíl od chromothripsis, kde je stěžejní formace mikrojádra) (Baca et al., 2013). Na tom se mohou velkou měrou podílet transkripční faktory, které představují proteiny řídící rychlost transkripce genetické informace z molekuly DNA do RNA. Svou doménou se váží na specifické sekvence v DNA a regulují expresi genů ve správný čas na správném místě a v náležitém množství. Kromě podpory transkripce jsou i jejími častými inhibitory (Vaquerizas et al., 2009). V případě prvního pozorování chromoplexis u pacienta s nádorem prostaty se jednalo o androgenový receptor (AR), který představuje jaderný transkripční faktor zprostředkovávající působení steroidních hormonů (Baca et al., 2013). Je nezbytný pro diferenciaci prostaty včetně exprese jejích specifických genů jako např. gen *TMPRSS2*. ETS (E26 transformačně-specifické receptory) transkripční faktory se specificky váží do místa genomu obsahujícího motiv GGA(A/T). Ten je často obsažen ve vazebných místech pro AR. Transkripční faktor ETS přerušuje signální dráhu AR tím, že se váže na specifické genové lokusy inhibující jeho aktivitu a navozuje represivní epigenetické programy vedoucí k aberantní transkripci řízené androgeny (Bastus et al., 2010).



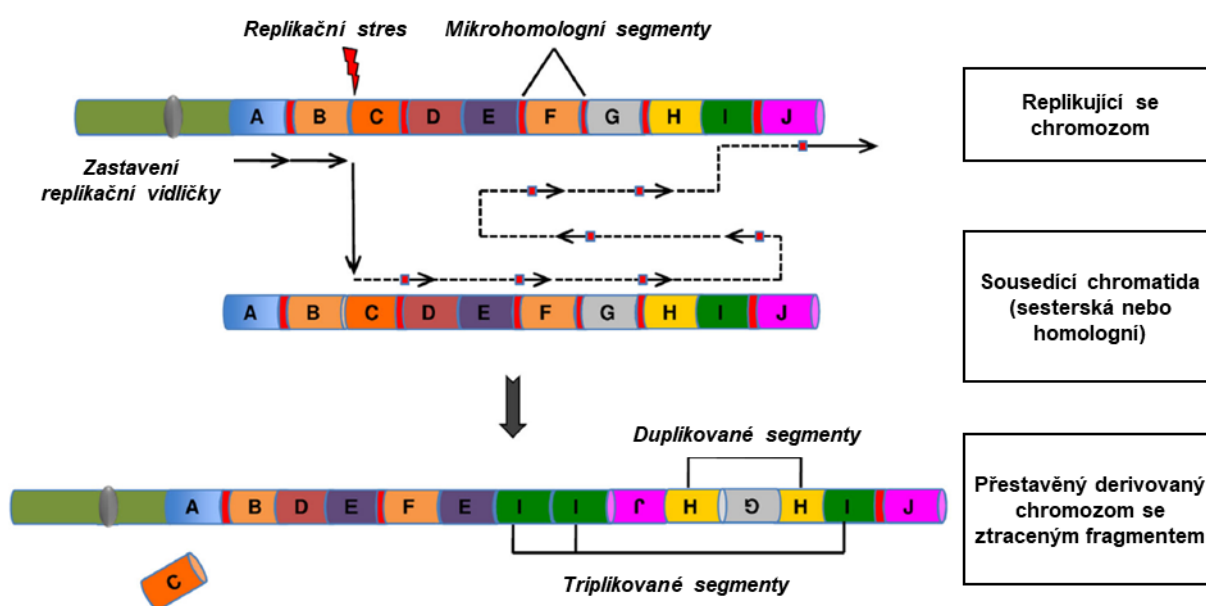
Obrázek 10 – Znáznornění průběhu chromoplexis. Podle: Pellestor, 2019



### 3.3 Chromoanasyntesis

Chromoanasyntesis (opakovaná – *ana* – syntéza) je souhrnné označení reparačních mechanismů zastoupených především procesy FoSTeS a MMBIR. Tento jev může napravit poškození, které vzniklo např. následkem chromothripsis či chromoplexis zmíněných výše. Opravné replikační mechanismy ale obvykle probíhají chybně a mohou vést až ke vzniku mnoha komplexních chromozomových přestaveb. Vzniklé strukturní variability představují především duplikace, triplikace, delece, translokace či inverze (Liu et al., 2011). Chromoanasyntesis může podněcovat i vytvoření marker chromozomů, které vznikají spojením až stovek chromozomových fragmentů (Grochowski et al., 2018).

Na replikačních defektech, které vedou k zastavení či úplnému zborcení replikační vidličky, se podílí řada exogenních i endogenních faktorů. Patří mezi ně např. replikační stres způsobený chemickými látkami (Durkin et al., 2008) nebo výskyt přídatných specifických sekvencí (např. LCR, SINE, LINE elementy) v genomu (Carvalho et al., 2009).



Obrázek 11 – Chromoanasyntesis indukovaná zastavením replikační vidličky. Podle: Pellestor, 2019

<b>Chromoanageneze</b>	<b>CHROMOTHRIPSIS</b>	<b>CHROMOPLEXIS</b>	<b>CHROMOANASYNTHESIS</b>
<b>Charakteristika</b>	lokalizovaný rozpad jednoho či více chromozomů (nebo jejich částí) a opětovné spojení fragmentů především mechanismem NHEJ	rozpad několika chromozomů až celého genomu a opětovné spojení fragmentů procesy NHEJ, alt-EJ	chybné reparační mechanismy FoSTeS a MMBIR jejichž následkem vznikají strukturní variability
<b>Počet zahrnutých chromozomů</b>	jeden či více (nebo jejich částí); nikdy ne celý genom	několik; i celý genom	jeden až celý genom
<b>Počet zlomových míst</b>	desítky až stovky	$\geq 5$ až desítky	$\geq 5$ až stovky
<b>Distribuce aberací</b>	v klastrech	rozptýlené	v klastrech i rozptýlené
<b>Zastoupení v tumorigenezi</b>	všechny typy nádorů	všechny typy nádorů	všechny typy nádorů

*Tabulka 1 – Přehled chromoanagenezí. Podle: Stephens et al., 2011, Baca et al., 2013, Liu et al., 2011*

## 4 Nejdůležitější cytogenomické metody detekce chromozomových přestaveb

Chromoanageneze lze detekovat za pomoci cytogenetických a molekulárních metod. Ty zahrnují hybridizační techniky, tedy metodu FISH (fluorescenční *in situ* hybridizace) a její různé modifikace, mikročipové technologie pro detekci jednonukleotidových polymorfismů (SNP array) či komparativní genomovou hybridizaci na čípech (array CGH) a moderní sekvenační techniky (NGS).

Hybridizační techniky jsou založeny na schopnosti hybridizace nukleových kyselin, tzn. jejich denaturaci a zpětné renaturaci za vhodných podmínek. Základní metodou je FISH, při které se používají fluorescenčně značené sondy, tedy úseky DNA o známé sekvenci. Denaturovaná sonda se nanáší na preparát s denaturovanými chromozomy a následně za vhodných podmínek dochází k vazbě komplementárních úseků jednovláknových DNA. Po proběhnuté hybridizaci lze ve fluorescenčním mikroskopu sledovat signály navázaných sond v konkrétních chromozomových oblastech. Existují různé typy sond dle toho, do které z chromozomových oblastí se váží (např. centromerické, lokus-specifické či malovací sondy) (Volpi a Bridger, 2008).

Postupně byly vyvinuty modifikace metody FISH – např. interfázní (I-FISH), FISH s malovacími sondami pro celé chromozomy (WCP-FISH), mnohobarevná FISH (mFISH) a mnohobarevné pruhování s vysokou rezolucí (mBAND). Metoda I-FISH dokáže detekovat chromozomové aberace i v nedělicích se interfázních jádrech. Využívá se k rychlé detekci určitého počtu cílových sekvencí s využitím panelů specifických DNA sond. Umožňuje identifikovat geny zahrnuté v chromozomových přestavbách a přesnou polohu zlomových míst na chromozomech. Další uplatnění této metody lze nalézt při sledování velikosti patologického klonu a monitorování léčebné odpovědi. Nevýhodou metody je, že neposkytuje informace o celém genomu, a tedy všech případných aberacích. Mnohobarevná FISH umožňuje barevné rozlišení všech chromozomů v karyotypu včetně detekce veškerých přítomných aberací, a to i složitých komplexních přestaveb. Tato technika však neumožňuje přesné určení zlomových míst (Zemanová et al., 2019). Další modifikace metody FISH mBAND dokáže přesně lokalizovat zlomová místa na aberantních chromozomech. Umožňuje však sledovat pouze omezený počet cílových sekvencí a neposkytuje informace o celém genomu (Chudoba et al., 1999).

Čipové technologie poskytují analýzu celogenomové DNA. Tyto metody vynikají svou vysokou citlivostí (cca 20–200 kbp). Umožňují velmi přesnou detekci nebalancovaných aberací ve formě změny počtu kopií DNA. Dále jsou to metody vhodné pro určování zlomových míst a detekci uniparentálních disomií. Při použití RNA čipů lze sledovat také genovou expresi. Tyto technologie neumožňují detekci balancovaných strukturních aberací, zastoupení aberací v různých buněčných kloních a detekci malých buněčných klonů (Shaffer et al., 2007).

Během jediného hybridizačního experimentu je možné za použití metody array CGH analyzovat celý genom. Metoda využívá tzv. referenční DNA ze zdravých buněk a DNA izolovanou ze studovaných buněk. Tyto DNA jsou značeny dvěma odlišnými fluorochromy a smíchány v poměru 1:1. Vzniklá hybridizační směs se nanáší na čip (array), který představuje skleněná nebo plastová destička. Na čipu jsou fixovány až tisíce oligonukleotidů, případně zde může být ukotven i celý genom. Po proběhlé hybridizaci se porovnává intenzita fluorescenčních signálů, která odhalí přesné geny či chromozomové oblasti, kde došlo k zisku nebo ztrátám genetického materiálu. Další mikročipovou technikou je metoda SNP array používaná pro odhalení jednonukleotidových polymorfizmů. Tato metoda umožňuje detekovat zisky i ztráty genetického materiálu a navíc také ztráty heterozygotnosti (LOH) (Shaffer et al., 2007).

V poslední době došlo k prudkému rozvoji vysoce výkonných sekvenačních technologií umožňujících cílené sekvenování vybraných úseků genomu, kompletní sekvenování celého genomu (WGS) či exomu (WES). Metody masivního paralelního sekvenování označované za sekvenování nové generace (NGS) umožňují celogenomovou analýzu balancovaných i nebalancovaných aberací. Oproti klasickým metodám jsou daleko citlivější a poskytují rovněž informace o genetické predispozici k nádorovým onemocněním. Nevýhodou NGS technik je, že neumožňují detekci nezávislých buněčných klonů, které často významně ovlivňují průběh onemocnění. Stejně tak, pokud není použita analýza jednotlivých buněk, neumožňují sledovat klonální heterogenitu. Zastoupení jednotlivých buněčných klonů lze NGS metodami detekovat pouze nepřímo (Zemanová et al., 2019).

Přes svoji vysokou citlivost a nesporné výhody nemají moderní metody zatím v současné době potenciál zcela nahradit metody klasického karyotypování. NGS technologie mají stále omezení ve své vysoké bioinformatické, finanční a interpretační náročnosti. Významným způsobem ale doplňují výsledky z konvenční cytogenetické analýzy založené na pruhovacích technikách. Tento zlatý standard v detekci chromozomových aberací poskytuje komplexní informace o celém genomu studovaných buněk včetně analýzy heterogenních buněčných klonů.

Nedostatkem těchto klasických metod však zůstává jejich nízká rozlišovací schopnost (Zemanová et al., 2019).

Během stanovování diagnózy nádorového onemocnění je důležité analyzovat karyotyp jednotlivých buněk, sledovat klonální vývoj spolu se současnou detekcí všech heterogenních buněčných klonů. Vhodně zvolená kombinace cytogenomických technik podává komplexní informace o genomu studovaných buněk. Umožňuje záchyt kryptických strukturních aberací a heterogenních klonů, které mohou hrát významnou roli v patogenezi onemocnění. (Zemanová et al., 2019).

Metoda	Konvenční karyotypování	WCP-FISH	I-FISH	mFISH	mBAND	array-CGH/SNP	NGS
Analýza celého genomu	ano	ne	ne	ano	ne	ano	ano
Detekce balancovaných aberací	ano	ano	ano	ano	ano	ne	ano
Detekce nebalancovaných aberací	ano	ano	ano	ano	ano	ano	ano
Detekce genových mutací	ne	ne	ne	ne	ne	ano	ano
Detekce UPD	ne	ne	ne	ne	ne	ano	ne
Detekce heterogenních klonů	ano	ano	ano	ano	ano	ne	ne
Rozlišení	-5 Mb	-5 Mb	-100 kb	-5 Mb	-5 Mb	-20-200 kb	-100 bp - 150 kb
Limity detekce	závisí na <i>in vitro</i> proliferaci	závisí na <i>in vitro</i> proliferaci	-1-5 %	závisí na <i>in vitro</i> proliferaci	závisí na <i>in vitro</i> proliferaci	-15-20 %	závisí na pokrytí
Buněčná populace	dělící se buňky	dělící se buňky	všechny buňky	dělící se buňky	dělící se buňky	všechny buňky	všechny buňky

Tabulka 2 – Porovnání cytogenomických vyšetřovacích metod. Převzato z: Zemanová et al., 2019

## 5 Úloha komplexních aberací v nádorovém procesu

Populace nádorových buněk představuje komplexní systém tvořený mnoha geneticky příbuznými klony. Pro tyto buňky je charakteristická progresivní kumulace změn v klíčových genech a signálních drahách, které kontrolují proliferaci buněk. Vzniklé defekty nezřídka poskytují buňkám selekční výhodu a umožňují proliferaci nádorového klonu. Diverzita jednotlivých klonů vede ke vzniku genetické, epigenetické a fenotypové variability, která často představuje hlavní překážku v přesné diagnostice a následné léčbě pacientů s nádorovým onemocněním (McGranahan a Swanton, 2017).

Komplexní aberace bývají často rozsáhlé a jejich následkem může dojít i k hromadné aktivaci a amplifikaci onkogenů, nebo naopak k inaktivaci nádorových supresorových genů (Stephens et al., 2011). K potlačení funkce tumor supresorových genů obvykle dochází prostřednictvím delecí. Onkogeny představují aktivované geny zodpovědné za řadu různých funkcí souvisejících s normálním růstem nebo reparací poškozené DNA. Alterace pouze jedné alely vede k jejich abnormální expresi a nekontrolovatelné proliferaci buněk (Baeissa et al., 2017).

Chromothripsis byla popsána u všech typů nádorů a její výskyt je u onkologicky nemocných pacientů spojován s nepříznivou prognózou (Magrangeas et al., 2011). Tyto rozsáhlé aberace mohou nastat také v důsledku léčby pacienta. Podávání léčiv v podobě chemických látek může zapříčinit vznik sekundárních mutací v nádorových buňkách potenciálně způsobujících rezistenci na nádorovou terapii (Rausch et al., 2012). Adaptace buněk vystavených léčivým přípravkům může být způsobena také epigenetickými mechanismy (Sharma et al., 2010).

Mechanismus chromoplexis byl poprvé popsán u pacienta s karcinomem prostaty (Baca et al., 2013). Další analýzy prokázaly, že se vyskytuje i u velkého spektra dalších nádorových onemocnění. Následkem chromoplexis velice často dochází ke vzniku fúzních genů, které přispívají k nestabilitě genomu (Anderson et al., 2018).

## 6 Závěr

Tato práce přináší ucelený přehled komplexních chromozomových aberací v nádorových buňkách. Shrnuje jejich základní charakteristiky a možné mechanismy vzniku.

Až do nedávné doby se předpokládalo, že komplexní karyotypy vznikají průběžnou kumulací genetických změn v genomu nádorových buněk, tj. v důsledku postupného klonálního vývoje. Některé komplexní přestavby jsou však natolik složité a rozsáhlé, že jejich vznik lze jen těžko vysvětlit postupnou kumulací aberací v průběhu času. U takto složitých změn se jako pravděpodobnější jeví teorie, že vznikly v rámci krátkého časového úseku nebo dokonce během jediné katastrofické události.

Recentně popsané komplexní změny genomu, chromoanageneze, proto pomohly objasnit řadu dříve nevysvětlitelných jevů. Jejich objev poskytl zcela nový pohled na možné příčiny a mechanismy vzniku komplexních aberací a poukázal na extrémní plastičnost našeho genomu. Dle charakteristických rysů se chromoanageneze dělí na chromothripsis, chromoplexis a chromoanasyntesis.

Chromothripsis představuje masivní rozpad jednoho či více chromozomů na malé fragmenty. Ty jsou posléze znovu spojovány, nejčastěji mechanismem NHEJ. Reparační procesy však probíhají chybně a dochází ke vzniku vysoce přestavěných chromozomů. Příčina vzniku chromothripsis zatím není jasná. Jako nejpravděpodobnější vysvětlení klastrového výskytu aberací se jeví teorie mikrojader. Další možnou příčinou je abraze telomer, která nejlépe vysvětluje častý záchyt chromothripsis v distálních oblastech chromozomů. Se sníženou ochranou chromozomového konce roste riziko jeho poškození např. exogenními faktory, jako je ionizační záření. Jejich působení může zapříčinit řadu dalších abnormalit. Skládání chromozomových fragmentů za vzniku četných chromozomových aberací se vyskytuje také u druhého typu chromoanagenezí, a to chromoplexis. Jejím vzniku přispívá zejména replikační nebo transkripční stres. Chromoanasyntesis představuje reparační mechanismy zastoupené především replikačními procesy FoSTeS a MMBIR. Ty probíhají následkem replikačního stresu chybně a vedou ke vzniku chromozomových přestaveb.

K objevu těchto nezvyklých typů komplexních aberací přispělo zavedení moderních cytogenomických metod. Velkou měrou napomohly metody čipových technologií a sekvenování nové generace.

Chromoanageneze byly pozorovány u řady nádorových onemocnění a jejich výskyt obvykle souvisí s velmi špatnou prognózou pro daného pacienta. Současné studie naznačují, že

k těmto typům aberací dochází mnohem častěji, než se dříve předpokládalo. Je ale nezbytné přesně objasnit jejich mechanismy vzniku, důsledky v patofyziologii buněk a potenciální uplatnění v klinické praxi. Dle některých studií by totiž exprese vzniklých fúzních genů mohla vést ke zvýšení citlivosti buněk na určité druhy léčiv a bylo by proto možné je v budoucnu využít jako nových léčebných cílů. Správné porozumění mechanismům chromoanagenezí může tedy významně přispět k pochopení patogeneze a zlepšení léčby nádorových onemocnění.



## Seznam zdrojů

\* sekundární zdroje

**Akagi, K., J. Li, T. R. Broutian, H. Padilla-Nash, W. Xiao, B. Jiang, J. W. Rocco, T. N. Teknos, B. Kumar, D. Wangsa, D. He, T. Ried, D. E. Symer a M. L. Gillison.** Genome-wide analysis of HPV integration in human cancers reveals recurrent, focal genomic instability. *Genome Research* 2014; **24**(2):185–199.

**Anderson, N. D., R. De Borja, M. D. Young, F. Fuligni, A. Rosic, N. D. Roberts, S. Hajjar, M. Layeghifard, A. Novokmet, P. E. Kowalski, M. Anaka, S. Davidson, M. Zarrei, B. I. Said, L. C. Schreiner, R. Marchand, J. Sitter, N. Gokgoz, L. Brunga, G. T. Graham, A. Fullam, N. Pillay, J. A. Toretzky, A. Yoshida, T. Shibata, M. Metzler, G. R. Somers, S. W. Scherer, A. M. Flanagan, P. J. Campbell, J. D. Schiffman, M. Shago, L. B. Alexandrov, J. S. Wunder, I. L. Andrulis, D. Malkin, S. Behjati a A. Shlien.** Rearrangement bursts generate canonical gene fusions in bone and soft tissue tumors. *Science* 2018; **361**(6405).

**Baca, S. C., D. Prandi, M. S. Lawrence, J. M. Mosquera, A. Romanel, Y. Drier, K. Park, N. Kitabayashi, T. Y. MacDonald, M. Ghandi, E. Van Allen, G. V. Kryukov, A. Sboner, J. P. Theurillat, T. D. Soong, E. Nickerson, D. Auclair, A. Tewari, H. Beltran, R. C. Onofrio, G. Boysen, C. Guiducci, C. E. Barbieri, K. Cibulskis, A. Sivachenko, S. L. Carter, G. Saksena, D. Voet, A. H. Ramos, W. Winckler, M. Cipicchio, K. Ardlie, P. W. Kantoff, M. F. Berger, S. B. Gabriel, T. R. Golub, M. Meyerson, E. S. Lander, O. Elemento, G. Getz, F. Demichelis, M. A. Rubin a L. A. Garraway.** Punctuated evolution of prostate cancer genomes. *Cell* 2013; **153**(3):666–677.

**Baeissa, H., G. Benstead-Hume, C. J. Richardson a F. M. G. Pearl.** Identification and analysis of mutational hotspots in oncogenes and tumour suppressors. *Oncotarget* 2017; **8**(13):21290–21304.

**Baker, S. J, E. R. Fearon, J. M. Nigro, S. R. Hamilton, A. C. Preisinger, M. Jessup, P. Vantuinen, D. H. Ledbetter, D. F. Barker, Y. Nakamura, R. White a B. Vogelstein.** Chromosome 17 Deletions and p53 Gene Mutations in Colorectal Carcinomas. *Science* 1989; **244**(4901):217–221.

**Bastus, N. C., L. K. Boyd, X. Mao, E. Stankiewicz, S. C. Kudahetti, R. T. D. Oliver, D. M. Berney a Y. Jie Lu.** Androgen-induced TMPRSS2:ERG fusion in nonmalignant prostate

epithelial cells. *Cancer Research* 2010; **70**(23):9544–9548.

**Baudat, F., J. Buard, C. Gray, A. Adi, C. Ober, M. Przeworski, G. Coop a B. De Massy.** PRDM9 is a Major Determinant of Meiotic Recombination Hotspots in humans and mice. *Science* 2010; **327**(5967):1–7.

**Bozic, I., T. Antal, H. Ohtsuki, H. Carter, D. Kim, S. Chen, R. Karchin, K. W. Kinzler, B. Vogelstein a M. A. Nowak.** Accumulation of driver and passenger mutations during tumor progression. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2010; **107**(43):18545–18550.

**Campbell, I. M., T. Gambin, P. Dittwald, C. R. Beck, A. Shuvarikov, P. Hixson, A. Patel, A. Gambin, C. A. Shaw, J. A. Rosenfeld a P. Stankiewicz.** Human endogenous retroviral elements promote genome instability via non-allelic homologous recombination. *BMC Biology* 2014; **12**(1):4–13.

**Carbone, L., R. A. Harris, S. Gnerre, K. R. Veeramah, B. Lorente-Galdos, John Huddleston, Thomas J. Meyer, J. Herrero, C. Roos, B. Aken, F. Anaclerio, N. Archidiacono, C. Baker, D. Barrell, M. A. Batzer, K. Beal, A. Blancher, C. L. Bohrsen, M. Brameier, M. S. Campbell, O. Capozzi, C. Casola, G. Chiatante, A. Cree, A. Damert, P. J. De Jong, L. Dumas, M. Fernandez-Callejo, P. Flicek, N. V. Fuchs, I. Gut, M. Gut, M. W. Hahn, J. Hernandez-Rodriguez, L. W. Hillier, R. Hubley, B. Ianc, Z. Izsvák, N. G. Jablonski, L. M. Johnstone, A. Karimpour-Fard, M. K. Konkel, D. Kostka, N. H. Lazar, S. L. Lee, L. R. Lewis, Y. Liu, D. P. Locke, S. Mallick, F. L. Mendez, M. Muffato, L. V. Nazareth, K. A. Nevenon, M. O’Bleness, C. Ochis, D. T. Odom, K. S. Pollard, J. Quilez, D. Reich, M. Rocchi, G. G. Schumann, S. Searle, J. M. Sikela, G. Skollar, A. Smit, K. Sonmez, B. Ten Hallers, E. Terhune, G. W. C. Thomas, B. Ullmer, M. Ventura, J. A. Walker, J. D. Wall, L. Walter, M. C. Ward, S. J. Wheelan, C. W. Whelan, S. White, L. J. Wilhelm, A. E. Woerner, M. Yandell, B. Zhu, M. F. Hammer, T. Marques-Bonet, E. E. Eichler, L. Fulton, C. Fronick, D. M. Muzny, W. C. Warren, K. C. Worley, J. Rogers, R. K. Wilson a R. A. Gibbs.** Gibbon genome and the fast karyotype evolution of small apes. *Nature* 2014; **513**(7517):195–201.

**Carvalho, C. M. B., F. Zhang, P. Liu, A. Patel, T. Sahoo, C. A. Bacino, C. Shaw, S. Peacock, A. Pursley, J. Y. Tavyev, M. B. Ramocki, M. Nawara, E. Obersztyn, A. M. Vianna-Morgante, P. Stankiewicz, H. Y. Zoghbi, S. W. Cheung a J. R. Lupski.** Complex rearrangements in patients with duplications of MECP2 can occur by fork stalling and

template switching. *Human Molecular Genetics* 2009; **18**(12):2188–2203.

**Chudoba, I., A. Plesch, T. Lörch, J. Lemke, U. Claussen a G. Senger.** High resolution multicolor-banding: A new technique for refined FISH analysis of human chromosomes. *Cytogenetics and Cell Genetics* 1999; **84**(3–4):156–160.

**Crasta, K., N. J. Ganem, R. Dagher, A. B. Lantermann, E. V. Ivanova, Y. Pan, L. Nezi, A. Protopopov, D. Chowdhury a D. Pellman.** DNA breaks and chromosome pulverization from errors in mitosis. *Nature* 2012; **482**(7383):53–58.

**Crombach, A. a P. Hogeweg.** Chromosome rearrangements and the evolution of genome structuring and adaptability. *Molecular Biology and Evolution* 2007; **24**(5):1130–1139.

**De Pagter, M. S., M. J. Van Roosmalen, A. F. Baas, I. Renkens, K. J. Duran, E. Van Binsbergen, M. Tavakoli-Yaraki, R. Hochstenbach, L. T. Van Der Veken, E. Cuppen a W. P. Kloosterman.** Chromothripsis in healthy individuals affects multiple protein-coding genes and can result in severe congenital abnormalities in offspring. *American Journal of Human Genetics* 2015; **96**(4):651–656.

**Durkin, S. G., R. L. Ragland, M. F. Arlt, J. G. Mulle, S. T. Warren a T. W. Glover.** Replication stress induces tumor-like microdeletions in FHIT/FRA3B. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2008; **105**(1):246–251.

**Forment, J. V., A. Kaidi a S. P. Jackson.** Chromothripsis and cancer: Causes and consequences of chromosome shattering. *Nature Reviews Cancer* 2012; **2**(10):663–670.

**Garsed, D. W., O. J. Marshall, V. D. A. Corbin, A. Hsu, L. DiStefano, J. Schröder, J. Li, Z. P. Feng, B. W. Kim, M. Kowarsky, B. Lansdell, R. Brookwell, O. Myklebost, L. Meza-Zepeda, A. J. Holloway, F. Pedoutour, K. H. A. Choo, M. A. Damore, A. J. Deans, A. T. Papenfuss a D. M. Thomas.** The Architecture and Evolution of Cancer Neochromosomes. *Cancer Cell* 2014; **26**(5):653–667.

**Gilbert, F..** A Classification of Chromosome Abnormalities in Cancer. *Journal of the National Cancer Institute* 1983; **71**(6):1107–1114.

**Grochowski, C. M., S. Gu, B. Yuan, J. Tcw, K. J. Brennand, J. Sebat, D. Malhotra, S. McCarthy, U. Rudolph, A. Lindstrand, Z. Chong, D. L. Levy, J. R. Lupski a C. M. B. Carvalho.** Marker chromosome genomic structure and temporal origin implicate a chromoanasythesis event in a family with pleiotropic psychiatric phenotypes. *Human Mutation* 2018; **39**(7):939–946.

**Guo, X., J. Ni, Z. Liang, J. Xue, M. F. Fenech a X. Wang.** The molecular origins and pathophysiological consequences of micronuclei: New insights into an age-old problem. *Mutation Research* 2019; **779**:1–35.

**Hatch, E. M., A. H. Fischer, T. J. Deerinck a M. W. Hetzer.** Catastrophic Nuclear Envelope Collapse in Cancer Cell Micronuclei. *Cell* 2013; **154**(1):47–60.

**Holland, A. J. a D. W. Cleveland.** Mechanisms and consequences of localized, complex chromosomal rearrangements in cancer and developmental diseases. *Nature Medicine* 2012; **18**(11):1630–1638.

**Juliussin, G., K. Friberg a G. Gahrton.** Consistency of Chromosomal Aberrations in Chronic B- Lymphocytic Leukemia. *Cancer Cell* 1988; **62**:500–506.

**Kageyama, K., A. Sugiyama, S. Murasawa, Y. Asari, K. Niioka, Y. Oki a M. Daimon.** Aphidicolin inhibits cell proliferation via the p53-GADD45 $\beta$  pathway in AtT-20 cells. *Endocrine Journal* 2015; **62**(7):645–654.

**Kloosterman, W. P., V. Guryev, M. Van Roosmalen, K. J. Duran, E. De Bruijn, S. C. M. Bakker, T. Letteboer, B. Van Nesselrooij, R. Hochstenbach, M. Poot a E. Cuppen.** Chromothripsis as a mechanism driving complex de novo structural rearrangements in the germline. *Human Molecular Genetics* 2011; **20**(10):1916–1924.

**Lauer, J., C. K. J. Shen a T. Maniatis.** The chromosomal arrangement of human  $\alpha$ -like globin genes: Sequence homology and  $\alpha$ -globin gene deletions. *Cell* 1980; **20**(1):119–130.

\* **Leister, D.** Origin, evolution and genetic effects of nuclear insertions of organelle DNA. *Trends in Genetics* 2005; **21**(12):655–663.

\* **Liehr, T., S. Cirkovic, T. Lalic, M. Guc-Scekic, C. De Almeida, J. Weimer, I. Iourov, M. I. Melaragno, R. S. Guilherme, E. G. G. Stefanou, D. Aktas, K. Kreskowski, E. Klein, M. Ziegler, N. Kosyakova, M. Volleth a A. B. Hamid.** Complex small supernumerary marker chromosomes - An update. *Molecular Cytogenetics* 2013; **6**(1):1–6.

**Liu, P., A. Erez, S. C. Sreenath Nagamani, S. U. Dhar, K. E. Kołodziejska, A. V. Dharmadhikari, M. L. Cooper, J. Wiszniewska, F. Zhang, M. A. Withers, C. A. Bacino, L. D. Campos-Acevedo, M. R. Delgado, D. Freedenberg, A. Garnica, T. A. Grebe, D. Hernández-Almaguer, L. Immken, S. R. Lalani, S. D. McLean, H. Northrup, F. Scaglia, L. Strathearn, P. Trapane, S. H. L. Kang, A. Patel, S. W. Cheung, P. J. Hastings, P. Stankiewicz, J. R. Lupski a W. Bi.** Chromosome catastrophes involve

replication mechanisms generating complex genomic rearrangements. *Cell* 2011; **146**(6):889–903.

**Magrangeas, F., N. C. Munshi, H. Avet-Loiseau a S. Minvielle.** Chromothripsis identifies a rare and aggressive entity among newly diagnosed multiple myeloma patients 2011; **118**(3):675–679.

**McClintock, B.** The Stability of Broken Ends of Chromosomes in Zea Mays. *Genetics* 1941; **26**(2):234–282.

\* **McGranahan, N. a C. Swanton.** Clonal Heterogeneity and Tumor Evolution: Past, Present, and the Future. *Cell* 2017; **168**(4):613–628.

**Morishita, M., T. Muramatsu, Y. Suto, M. Hirai, T. Konishi, S. Hayashi, D. Shigemizu, T. Tsunoda, K. Moriyama a J. Inazawa.** Chromothripsis-like chromosomal rearrangements induced by ionizing radiation using proton microbeam Irradiation system. *Oncotarget* 2016; **7**(9):10182–10192.

**Nowell, P. C.** The clonal evolution of tumor cell populations. *Science* 1976; **194**(4260):23–28.

**Pellestor, F.** Chromoanagenesis: Cataclysms behind complex chromosomal rearrangements. *Molecular Cytogenetics* 2019; **12**(1):1–12.

**Ramos, M. L. M., J. J. Lahuerta Palacios, B. Gil Fournier, J. L.Vivanco Martínez, J. Martinez-López, M. C. Ortiz Conde, A. Moreno Izquierdo, M. Moreno García a E. Barreiro Miranda.** Prognostic value of tumoral ploidy in a series of Spanish patients with acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Genetics and Cytogenetics* 2000; **122**(2):124–130.

**Rausch, T., D. T. W. Jones, M. Zapatka, A. M. Stütz, T. Zichner, J. Weischenfeldt, N. Jäger, M. Remke, D. Shih, P. A. Northcott, E. Pfaff, J. Tica, Q. Wang, L. Massimi, H. Witt, S. Bender, S. Pleier, H. Cin, C. Hawkins, C. Beck, A. Von Deimling, V. Hans, B. Brors, R. Eils, W. Scheurlen, J. Blake, V. Benes, A. E. Kulozik, O. Witt, D. Martin, C. Zhang, R. Porat, D. M. Merino, J. Wasserman, N. Jabado, A. Fontebasso, L. Bullinger, F. G. Rücker, K. Döhner, H. Döhner, J. Koster, J. J. Molenaar, R. Versteeg, M. Kool, U. Tabori, D. Malkin, A. Korshunov, M. D. Taylor, P. Lichter, S. M. Pfister a J. O. Korbel.** Genome sequencing of pediatric medulloblastoma links catastrophic DNA rearrangements with TP53 mutations. *Cell* 2012; **148**(1–2):59–71.

**Robinson, W. P., F. Bernasconi, S. Basaran, M. Yüksel-Apak, G. Neri, F. Serville,**

**P. Balicek, R. Haluza, L. M.S. Farah, G. Lüleci a A. A. Schinzel.** A somatic origin of homologous Robertsonian translocations and isochromosomes. *American Journal of Human Genetics* 1994; **54**(2):290–302.

**Sanborn, J. Z., S. R. Salama, M. Grifford, C. W. Brennan, S. Jhanwar, S. Katzman, L. Chin a D. Haussler.** Double minute chromosomes in glioblastoma multiforme are revealed by precise reconstruction of oncogenic amplicons. *Cancer Cell* 2013; **73**(19):6036–6045.

**Schoch, C., T. Haferlach, D. Haase, C. Fonatsch, H. Löffler, B. Schlegelberger, P. Staib, M. C. Sauerland, A. Heinecke, T. Büchner a W. Hiddemann.** Patients with de novo acute myeloid leukaemia and complex karyotype aberrations show a poor prognosis despite intensive treatment: A study of 90 patients. *British Journal of Haematology* 2001; **112**(1):118–126.

**\* Shaffer, L. G., A. L. Beaudet, A. R. Brothman, B. Hirsch, B. Levy, C. Lese Martin, J. T. Mascarello a K. W. Rao.** Microarray analysis for constitutional cytogenetic abnormalities. *Genetics in Medicine* 2007; **9**(9):654–662.

**Sharma, S. V., D. Y. Lee, B. Li, M. P. Quinlan, F. Takahashi, S. Maheswaran, U. McDermott, N. Azizian, L. Zou, M. A. Fischbach, K. K. Wong, K. Brandstetter, B. Wittner, S. Ramaswamy, M. Classon a J. Settleman.** A Chromatin-Mediated Reversible Drug-Tolerant State in Cancer Cell Subpopulations. *Cell* 2010; **141**(1):69–80.

**Shaw, C. J. a J. R. Lupski.** Non-recurrent 17p11.2 deletions are generated by homologous and non-homologous mechanisms. *Human Genetics* 2005; **116**(1–2):1–7.

**Stephens, P. J., C. D. Greenman, B. Fu, F. Yang, G. R. Bignell, L.J. Mudie, E. D. Pleasance, K. Wai Lau, D. Beare, L. A. Stebbings, S. McLaren, M. Lay Lin, D. J. McBride, I. Varela, S. Nik-Zainal, C. Leroy, M. Jia, A. Menzies, A. P. Butler, J. W. Teague, M. A. Quail, J. Burton, H. Swerdlow, N. P. Carter, L. A. Morsberger, C. Iacobuzio-Donahue, G. A. Follows, A. R. Green, A. M. Flanagan, M. R. Stratton, P. A. Futreal a P. J. Campbell.** Massive genomic rearrangement acquired in a single catastrophic event during cancer development. *Cell* 2011; **144**(1):27–40.

**Storchová, Z. a W. P. Kloosterman.** The genomic characteristics and cellular origin of chromothripsis. *Current Opinion in Cell Biology* 2016; **40**:106–113.

**Szatrowski, T. P. a C. F. Nathan.** Production of Large Amounts of Hydrogen Peroxide by Human Tumor Cells. *Cancer Research* 1991; **51**(3):794–798.

**Tan, E. H., I. M. Henry, M. Ravi, K. R. Bradnam, T. Mandakova, M. P. A. Marimuthu, I. Korf, M. A. Lysak, L. Comai a S. W. L. Chan.** Catastrophic chromosomal restructuring during genome elimination in plants. *eLife* 2015; **4**:1–16.

\* **Thompson, S. L. a D. A. Compton.** Chromosomes and cancer cells. *Chromosome Research* 2011; **19**(3):433–444.

**Tubio, J. M. C. a X. Estivill.** Cancer: When catastrophe strikes a cell. *Nature* 2011; **470**(7335):476–477.

\* **Vaquerizas, J. M., S. K. Kummerfeld, S. A. Teichmann a N. M. Luscombe.** A census of human transcription factors: Function, expression and evolution. *Nature Reviews Genetics* 2009; **10**(4):252–263.

**Vermeulen, S., B. Menten, N. Van Roy, H. Van Limbergen, A. De Paepe, G. Mortier a F. Speleman.** Molecular cytogenetic analysis of complex chromosomal rearrangements in patients with mental retardation and congenital malformations: Delineation of 7q21.11 breakpoints. *American Journal of Medical Genetics* 2004; **124A**(1):10–18.

\* **Volpi, E. V. a J. M. Bridger.** FISH glossary: An overview of the fluorescence in situ hybridization technique. *BioTechniques* 2008; **45**(4):385–409.

\* **Weckselblatt, B. a M. Katharine Rudd.** Human Structural Variation: Mechanisms of Chromosome Rearrangements. *Trends in Genetics* 2015; **31**(10):587–599

**Závacká, K., K. Plevová, M. Jarošová a Š. Pospíšilová.** Chromotripse – rozsáhlé chromozomové přestavby a jejich význam u onkologických onemocnění. *Klinická Onkologie* 2019; **32**(2):101–108.

\* **Zemanová, Z., K. Michalová a J. Březinová.** Význam cytogenetické a molekulárně cytogenetické analýzy v diagnostice hematologických malignit v době nových sekvenčních technik. *Časopis lékařů českých* 2019; **158**(1):22–27.

**Zhang, F., M. Khajavi, A. M. Connolly, C. F. Towne, S. D. Batish, J. R. Lupski a S. Louis.** Copy of Training and Personal Protective Equipment Register 2015; **41**(7):849–53.